



University of Groningen

## Bovine heart NADH

Brink, Jacob

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

### *Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

### *Publication date:*

1988

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

### *Citation for published version (APA):*

Brink, J. (1988). Bovine heart NADH: ubiquinone oxidoreductase. Structural studies of fragments and whole enzyme. Groningen: s.n.

### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# BOVINE HEART NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE: Structural studies of fragments and whole enzyme.

Elektronenmicroscopisch onderzoek aan het runderhartenzyme NADH:ubiquinon oxidoreductase (NADH dehydrogenase) vormt het onderwerp van dit proefschrift.

Het enzyme bevindt zich in de mitochondriële binnenmembraan en verzorgt de oxidatie van metabolisch gegenereerd NADH. Bij deze oxidatie worden twee elektronen overgedragen op ubiquinon (een lipofiel carriermolekuul), van waaruit ze verder worden doorgegeven aan de rest van de elektronen-transportketen. Tijdens de oxidatie van NADH worden protonen over de mitochondriële binnenmembraan getransporteerd door het enzyme (translokatie). Doordat ook de andere enzymen van de transportketen (cytochroom reductase en cytochroom oxidase) protonen translokeren tijdens hun katalytische cyclus, ontstaat er een elektrochemische protongradiënt ( $\Delta\mu_{\text{H}}^+$ ) over de binnenmembraan. Deze gradiënt vormt voor het ATP synthase de drijfveer om ADP te fosforyleren tot ATP. NADH dehydrogenase draagt dus indirect bij tot de ATP-synthese van het organisme (hoofdstuk 1).

Wij zijn geïnteresseerd in de structuur van het NADH dehydrogenase. Ondanks vele jaren van biochemisch onderzoek is er nauwelijks meer inzicht verkregen in de ruimtelijke organisatie van dit enzyme. Het is een gecompliceerd enzyme, doordat het per functionele eenheid uit 26 verschillende polypeptideketens bestaat met een totale massa van ongeveer 600 kDa. Verder bevat het per eenheid één FMN en een aantal ijzer-zwavel- (FeS-) clusters.

In 1979 is gestart met EM-onderzoek aan dit enzyme, dat na isolatie beter bekend staat als complex I. Uit dit preparaat werden door Boekema et al. twee-dimensionale (2D-) kristallen verkregen. Dit zijn kristallen van slechts één molekuul dikte, waarbij de molekulen in twee richtingen regelmatig gerangschikt zijn. De repeterende eenheid (eenheidscel) van die 2D-kristallen werd m.b.v. elektronenmicroscopie en beeldverwerking gereconstrueerd, waarbij correlatietechnieken gebruikt worden. Hierbij wordt de signaal:ruis-verhouding verbeterd, waardoor een meer gedetailleerde beeld van de structuur wordt verkregen. Hieruit werd geconcludeerd dat de eenheidscel een dimeer van het volledige enzyme zou bevatten, waarbij elk monomeer uit twee bijna identieke delen bestaat. Door alle vier delen van

het molekuul lopen centrale holtes van boven naar beneden met een diameter van ongeveer 1,5 nm.

Het doel van het onderzoek, dat in dit proefschrift beschreven staat, was voortzetting van dit structuuronderzoek o.a. door de lokalisatie van diverse subeenheden in het enzyme m.b.v. specifieke, monovalente antilichaamfragmenten (Fab's). Fab's zijn door anderen eveneens voor plaatsbepaling van subeenheden toegepast in het geval van kristallijne objecten (bacteriofagen; Aebi et al.) en van niet-kristallijne objecten (hemocyanines; Lamy et al., Markl et al.).

Wij hebben de eerdergenoemde 2D-kristallen behandeld met bepaalde Fab's, waarna hun positie in de eenheidscel gelokaliseerd werd m.b.v. beeldverwerking. In hoofdstuk 2 wordt het onderzoek beschreven met Fab's gericht tegen de 75 kDa subeenheid, waarvan slechts één kopie per eenheid van 600 kDa voorkomt. Beeldverwerking van met Fab-gelabelde 2D-kristallen resulteerde in vier Fab-bindingsplaatsen per eenheidscel. Omdat de ruimte binnen de eenheidscel te gering was voor vier intacte enzyme molekulen, konden de 2D-kristallen slechts fragmenten van het natieve enzyme bevatten. Een numerieke analyse van het berekende diffractiepatroon van niet-gelabelde 2D-kristallen resulteerde in de vaststelling van de kristalsymmetrie  $p4_{2mm}$ ; de ruimtengroep bleek  $P4_2$  te zijn. Dit impliceerde dat per eenheidscel acht identieke asymmetrische eenheden aanwezig waren. Vergelijking van de beelden van het eiwit in deze eenheidscel met die van geïsoleerde enzyme fragmenten (FeS-bevattende eiwitfragmenten) onthulde een opmerkelijke overeenkomst. Vermoedelijk bevatten de 2D-kristallen per eenheidscel daarom acht van deze FeS-bevattende eiwitfragmenten.

Het onderzoek werd vervolgens in twee richtingen gesplitst. In de eerste plaats is getracht de structuur van de 2D-kristallen te preciseren door variatie van de verbindingen voor negatief kleuren (hoofdstuk 3) en door toepassing van cryo-elektronenmicroscopie (hoofdstuk 4). In de tweede plaats is gepoogd om het volledige enzyme alsnog in twee dimensies te kristalliseren (hoofdstuk 5).

De geprojecteerde eenheidscel van de met diverse negatief kleurmiddelen behandelde 2D-kristallen werd berekend via een filtering van de elektronen mikrofoto's in de Fourier-ruimte. De resolutie bleek te variëren van 1,5 nm (met uranyl-acetaat, -nitraat en -sulfaat, ammoniummolybdaat en fosfowolframaat), via 1,9 nm (silicowolframaat) tot 3,8 nm (wolframaat). De roosterparameters werden in alle gevallen bepaald als  $a = b = 14,9$  nm met de hoek  $\gamma$  tussen beide roostervectoren gelijk aan  $90^\circ$ . Het gefilterde beeld van

het eiwit in de diverse kleurmiddelen vertoonde onderling weinig verschil bij gebruik van de uranyl-verbindingen en het molybdaat, dit in tegenstelling tot gebruik van de drie types wolframaten. Om deze visuele interpretatie te bevestigen werd een statistische analyse-techniek (correspondentie-analyse) toegepast. Deze techniek kan een populatie van onderling weinig verschillende beelden op basis van die verschillen in kleinere groepen indelen. Dit bevestigde onze interpretatie, omdat de beelden naar kleurmiddel gerangschikt werden. Verder bleek, dat subtiele verschillen tussen bijv. de diverse uranyl-verbindingen konden worden waargenomen. Naast deze kleurmiddel-afhankelijke verschillen werd een opmerkelijk onderscheid van prepareer-technische aard geconstateerd. Gevonden werd, dat de vier centrale holtes in de eenheidscel niet worden waargenomen bij gebruik van met glimontlading behandelde steunvliezen. De oorzaak ligt vermoedelijk aan veranderde interacties tussen eiwit, kleurmiddel en vlies. Eiwit-deformaties lijken geen rol te spelen gezien de hoge resolutie van de kristalbeelden (1,5 nm) na het prepareren op geladen vliezen.

Om de hierboven beschreven invloeden te minimaliseren werd gekozen voor de techniek van het inbedden in amorf ijs (cryo-EM) door snel invriezen van het gehydrateerde materiaal. Opnames werden gemaakt bij  $-150^{\circ}\text{C}$  en bij twee focuseringen van de objectief lens. Eén opname werd 400 nm onderfocus gemaakt, terwijl bij de tweede opname meer (1.3  $\mu\text{m}$ ) werd gedefocuseerd. De geprojecteerde eenheidscellen van beide opnames werden gereconstrueerd met een resolutie van 1,38 en 1,9 nm door toepassing van diverse beeldverwerkingsprocedures. Om beide projecties tot één structuur te combineren, werden alleen optimaal aanwezige ruimtefrequenties van de opnames gebruikt. Dit werd bereikt door in de Fourier ruimte een zône-filter (van  $1/2,4$  tot  $1/1,0 \text{ nm}^{-1}$ ) toe te passen op het gemiddelde van de eerste opname en een hoog-af filter ( $1/2,4 \text{ nm}^{-1}$ ) op het gemiddelde van de tweede opname. Combinatie van deze complementaire Fourier componenten leidde tot een geprojecteerde structuur met een fase-overdracht ongeveer gelijk aan één voor reciproce afstanden van  $1/5,0$  tot  $1/1,0 \text{ nm}^{-1}$ . Het resultaat bleek uit vier bijna gelijke delen te bestaan. Twee delen vertoonden elk een gebied met minder verstrooiend vermogen; deze plekken waren identiek met de posities van de centrale holtes, welke soms in negatief gekleurde eenheidscellen werden waargenomen. In de andere twee delen waren geen aanwijzingen te vinden voor de aanwezigheid van deze holtes. Verder bleken de vier eiwit delen van de eenheidscel in amorf ijs, meer dan in negatief kleuren, duidelijk gescheiden zichtbaar te zijn. Overigens bleek de structuur in amorf ijs en negatief

kleurmiddel weinig van elkaar te verschillen.

In hoofdstuk 2 werd beschreven, dat niet het gehele enzyme maar een fragment was gekristalliseerd. Via diverse methodes werd geprobeerd het volledige enzyme te kristalliseren, waarbij uitgegaan werd van zowel complex I als ook van het nauw verwante in water oplosbare NADH dehydrogenase. Uit complex I werden met ammoniumsulfaat na weg dialyseren van het detergens kleine, slecht geordende kristallen verkregen, die vermoedelijk het gehele enzyme bevatten. Deze verschilden echter niets van soortgelijke kristallen verkregen door Boekema et al.

Fusie met "lipidvesicles" gevolgd door dialyse, analoog aan de methode gevolgd bij de 2D-kristallisatie van het NADH dehydrogenase uit de schimmel Neurospora crassa (Leonard et al.), leverde alleen strengen van molekulen op en heel kleine semi-kristallijne aggregaten.

Tenslotte werd daarom getracht het enzyme verder te zuiveren. Dit lukte ten dele met complex I d.m.v. hoge prestatie vloeistofchromatografie (HPLC). Kristallisatie pogingen met dit opgezuiverde enzyme leverden wel aggregaten op, die een begin van een 2D-kristallisatie vertoonden, doch nog niet de beoogde grote 2D-kristallen. De hoge mate van aggregatie van beide enzyme preparaten, die in het elektronenmicroscop al tijdens de HPLC-zuivering werd gekonstateerd, werkte vermoedelijk belemmerend op de kristallisaties. Deze aggregatie is volgens ons het gevolg van ontoereikende isolatie en zuiverings-procedures. Een wezenlijke verbetering van de kristallisaties lijkt dan ook slechts mogelijk met een zuivere, monodisperse enzyme-oplossing. Geschikte methodes hiervoor kunnen zijn hydrofobe interactie-en/of affiniteits-HPLC, terwijl de in water oplosbare NADH dehydrogenases geïsoleerd volgens Huang en Pharaon en/of volgens Baugh en King meer geschikte enzyme-preparaten kunnen zijn.

Als afsluiting van het proefschrift volgt een korte nabeschuiving (hoofdstuk 6).

38115/62